



Avaliação da eficiência de produção de clones bovinos a partir de células somáticas derivadas de amostras de sêmen criopreservado

Autora: Verônica Rafaela Benvenuti

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

INTRODUÇÃO

A clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) apresenta diversas aplicações científicas, entre as quais, destaca-se a preservação de animais de genética desejável, rara ou em extinção. Essa ferramenta de biotecnologia pode ser utilizada para geração de animais de importante impacto socioeconômico pecuário e também contribui com a preservação e recuperação de animais em risco de extinção ou já extintos, dos quais se disponha de sêmen congelado.

O objetivo do experimento foi determinar a eficiência da produção de embriões obtidos através da clonagem por TNCS pela técnica de *Handmade Cloning* (HMC), utilizando como doadoras de núcleo (carioplastos) células somáticas isoladas de amostras de sêmen bovino criopreservado (CSSs).

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Primeiro realizou-se a aspiração folicular de ovários de vacas provindos de abatedouro; b) os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram selecionados e submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por período de 17h, em incubadora a 37°C, expostos à atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada; c) após a maturação, os CCOs foram desnudados e identificou-se os oócitos maturados, através da presença do corpúsculo polar; d) o isolamento das células somáticas de palhetas de sêmen bovino criopreservado (figura A) foi realizado com auxílio da técnica de gradientes de Percoll®; e) os oócitos maturados foram submetidos ao procedimento de remoção da zona pelúcida; f) a produção dos citoplastos, foi feita através da retirada da bagagem genética, por bissecção dos oócitos (figura B); g) o DNA dos hemi-oócitos foi corado com Hoechst e com auxílio do microscópio com luz ultravioleta divididos em dois grupos, com ou sem (citoplastos) material genético; h) as membranas da célula somática e de dois citoplastos foram submetidas à eletrofusão (figura C); i) após, os embriões clones foram cultivados *in vitro* (CIV) em meio SOF, em incubadora a 37°C, expostos à atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ com umidade saturada; j) a taxa de clivagem dos embriões foi avaliada no Dia 2.



Figuras. Células isoladas de palhetas de sêmen (0,5 mL) criopreservadas (A); Oócito sem zona pelúcida bisseccionado (B); Dois citoplastos unidos à célula somática do sêmen antes da eletrofusão das membranas plasmáticas (C).

RESULTADOS

Foram realizadas três rotinas de clonagem pela técnica de HMC, utilizando as CSSs como carioplastos. Como controle os seguintes grupos foram empregados: a) partenoto com zona pelúcida; b) partenoto sem zona pelúcida; c) embrião clone com fibroblasto bovino como carioplasto (tabela).

Tabela: Embriões produzidos pela técnica HMC.

Estruturas	CIV		Clivagem	
	N	N	N	%
Partenotos com ZP	108	63	58,33	
Partenotos sem ZP	30	13	43,33	
Fibroblastos (carioplasto)	26	5	19,23	
CSSs (carioplasto)	10	3	30,0	

CONCLUSÃO

A eficiência da clonagem empregando-se CSSs como carioplastos foi baixa. Futuros experimentos serão conduzidos buscando a produção de blastocistos, que serão criopreservados ou transferidos para fêmeas receptoras.